

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.013

· 技术方法 ·

改良 CAM 移植瘤模型的制备及其对肿瘤血管新生抑制药物的筛选效果

叶宇翔, 周秦, 李江超, 袁俏冰, 韩露, 雷岩, 王丽京(广东药学院 血管生物学研究所, 广东 广州 510006)

[摘要] **目的:**以改良方法在鸡胚绒毛尿囊膜(chick chorioallantoic membrane, CAM)上接种人成神经胶质瘤 U87 细胞制备移植瘤,验证改良模型筛选抗肿瘤血管新生药物的有效性和可行性。**方法:**将鸡胚种蛋随机分为 2 组,分别使用传统方法与改良方法建立 CAM-U87 移植瘤模型;改良方法在鸡胚孵育中增加 9~16 h 的开窗适应期,再将特制的硅胶圈放置在 CAM 组织一级血管的半侧;硅胶圈内接种 U87 细胞建立 CAM-U87 移植瘤模型。模型的硅胶圈内分别加入经典抗血管新生药物沙利度胺(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和自主研发抗血管新药 G3B6,以 DMSO 为对照;体视显微镜观察肿瘤形态,H-E 染色法观察瘤组织新生微血管密度(microvessel density, MVD),原位杂交(in situ hybridization, ISH)技术检测血管标记物 VEGFR2 的表达。**结果:**成功制备改良 CAM-U87 细胞移植瘤,改良模型不影响 CAM 本身的血管生成,其瘤细胞接种成功率较传统模型显著升高[(70.00 \pm 4.226)% vs (41.25 \pm 5.154)%; $t=4.314, P=0.0007$],移植瘤体积显著增大[(60.20 \pm 6.012) vs (15.97 \pm 2.403) mm^3 ; $t=6.012, P<0.0001$]。沙利度胺和 G3B6 两药均能显著抑制移植瘤组织中的血管形成,使瘤组织中 MVD 显著降低[沙利度胺 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时(15.85 \pm 1.15)% vs (29.80 \pm 4.16)%; $t=2.49, P=0.0474$]、VEGFR2 表达明显减少。**结论:**改良方法成功制备 CAM-U87 移植瘤模型,经沙利度胺和 G3B6 验证,该模型对抗肿瘤血管新生药物的筛选具有良好的有效性和可行性。

[关键词] 鸡胚绒毛尿囊膜;移植瘤;胶质瘤;U87 细胞;肿瘤血管新生;药物筛选

[中图分类号] R73-35; R730.5; R739.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)02-0187-05

Development and application of a modified chick embryo chorioallantoic membrane xenograft model of tumorigenesis in screening tumor angiogenesis inhibitors

Ye Yuxiang, Zhou Qin, Li Jiangchao, Yuan Qiaobing, Han Lu, Lei Yan, Wang Lijing (Institute of Vascular Biology, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510006, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To modify the classical chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) xenograft model of tumorigenesis and evaluate the effectiveness and feasibility of the modified model in the screening of anti-angiogenesis drugs. **Methods:** Fertilized chicken eggs randomized into two groups. Eggs in the classical model group were grafted with U87 human glioma cells and the anti-angiogenic activity of test drugs, thalidomide (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), G3B6 and DMSO (the control) was determined by following the well-established classical methods. In the modified model group, the CAM was given an additional adaptation period of 9-16 h and then grafted with U8 cells by inoculating the cells into a silicone ring and then placing the ring on the half of the grade 1 vessel of the CAM. The test drugs were added into the silicone ring where their anti-angiogenic activity was evaluated. For both groups, the tumor morphology and the microvessel density (MVD) in the tumor tissue were examined under a stereo microscope with photos taken. Changes in the tumor histology was assessed by H-E staining and the expression of VEGFR2, the marker of the angiogenesis, was assessed by in situ hybridization. **Results:** The success rate of the xenograft was increased significantly without any negative effect on angiogenesis in the CAM in the modified model as compared with the classical model ([70 \pm 4.226]% vs [41.25 \pm 5.154]%; $t=4.314, P=0.0007$). The tumor volume was also significantly increased in the modified model group as

[基金项目] 广东省医学科研基金资助项目(No. A2013312);国家自然科学基金资助项目(No. 31271455, No. 31200861, No. 31100852, No. 81200308, No. 31200896)。Project supported by the Medicine Science Research Foundation of Guangdong Province(No. A2013312) and the National Natural Science Foundation of China (No. 31271455, No. 31200861, No. 31100852, No. 81200308, No. 31200896)

[作者简介] 叶宇翔(1990-),男,安徽省铜陵市人,硕士生,主要从事肿瘤分子生物学研究。E-mail: yeyuxiang12345@163.com

[通信作者] 王丽京(Wang Lijing, corresponding author), E-mail: wanglijing62@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140331.1728.010.html>

compared with the classical model group ($[60.20 \pm 6.012]$ vs $[15.97 \pm 2.403]$ mm³; $t = 6.012$, $P < 0.0001$). Both thalidomide and G3B6 effectively inhibited the angiogenesis and reduced the MVD and VEGFR2 expression in the tumor tissue. **Conclusion:** The modified xenograft CAM model of tumorigenesis developed in this study seems superior over the classical CAM model in studying tumorigenesis and screening anti-angiogenesis drugs.

[**Key words**] chorioallantoic membrane (CAM); xenograft; glioma; U87 cell; tumor angiogenesis; drug screening [Chin J Cancer Biother, 2014, 21(2): 187-191]

血管新生(angiogenesis)是毛细血管萌芽新生和从已有的血管中形成新血管网的过程,在肿瘤生长、侵袭、转移中起着重要的作用^[1-2]。在肿瘤释放的趋化因子和生长因子的作用下,毛细血管的内皮细胞发生迁移,形成新的血管。药物靶向抑制肿瘤的血管新生对于肿瘤的治疗有着重要意义。目前,抗肿瘤血管新生药物的研究大多采用人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)抑制成管法和 MTT 法^[3],其血管新生的模拟不够真实确切。也有通过裸鼠皮下移植瘤模型来观察药物对血管生成的干扰^[4],还有采用免疫组化或免疫荧光法来观察血管生成,但这些方法不能区分血管的三维形态^[5]、而且药物对血管的影响还因个体差异而不同^[6-8]。本课题对传统的鸡胚绒毛尿囊膜(chick chorioallantoic membrane, CAM)移植瘤模型进行改进,建立一种成功率较高的模拟体内肿瘤血管新生的模型,然后以经典抗肿瘤血管新生药物作用于该模型,以验证改良模型的有效性和可行性,以期对抗肿瘤血管新生药物的筛选提供良好的实验模型。

1 材料与方 法

1.1 细胞株与主要试剂

人成神经胶质瘤 U87 细胞由中山大学生命科学院屈良鹄教授惠赠,培养于含 10% 小牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml 的 DMEM 培养液中;鸡胚种蛋购于华南农业大学养殖场。沙利度胺(thalidomide)购自 Sigma 公司, GEB6 为本课题组自主研发的抗血管新生药物^[9-10](目前正在申请专利)。DMEM 购自 Gibco 公司, FBS 购自 Hyclone 公司, DMSO 购自广州化学试剂厂。SMZ168 体视显微镜购自 Motic 公司, CX41 正置显微镜购自 Olympus 公司。硅胶药圈(内径 100 nm, 外径 120 nm)取自美国康宁公司冻存管(货号 430659)外旋盖内侧顶部,高温灭菌。

1.2 改良 CAM 模型接种肿瘤细胞

文献[1,11-12]提供的为传统 CAM 模型制备方法,本课题将其改进如下:将 0 d 的鸡胚种蛋置于 38

℃、湿度 60% 的培育箱,气室朝上置于鸡蛋架上,持续孵育 8 ~ 9 d。将发育良好的种蛋在超净台上消毒后去除气室端外壳、外膜、内膜,暴露含有丰富血管的 CAM 组织,开窗后适应 9 ~ 16 h,用灭菌医用胶布封口,呈十字交叉。继续孵育 12 h 后,在超净台上揭开医用胶布,观察并淘汰没有一级血管的鸡胚种蛋和死胚种蛋。将硅胶药圈放置在 CAM 一级血管半侧。取对数生长期的 U87 细胞,用 0.25% 的胰酶消化、洗涤、重悬,向每个种蛋 CAM 的硅胶药圈中加入 30 μl 细胞悬液(约含 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞),保证加入的细胞悬液不流出胶圈,在鸡蛋外壳做好相应的标记并画 T 字(图 1)。用灭菌的医用胶布封口,继续孵育 30 h,从鸡蛋内侧采集照片,检查接种是否成功。两种方法各用鸡胚种蛋 80 个。

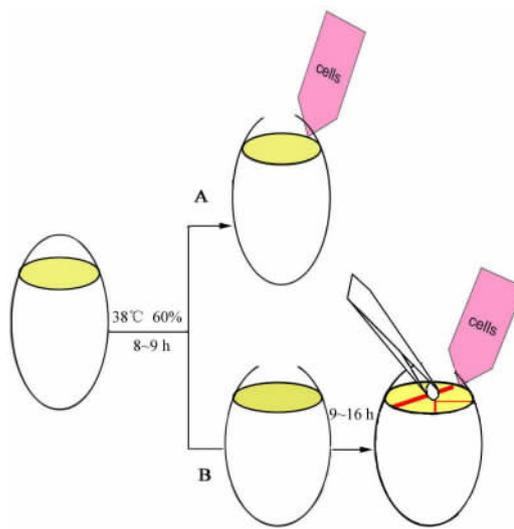


图 1 传统法(A)和改良法(B)CAM 接种肿瘤细胞的比较
Fig .1 Comparison of inoculating tumor cells on the CAM using the traditional method (A) and the modified method (B)

A: (1) 38 ℃, humidity 60%, incubating 8 ~ 9 d; (2) Open the cameral mantle and add tumor cells on the CAM.
B: (1) 38 ℃, humidity 60%, incubating 8 ~ 9 d; (2) Remove the cameral mantle and the chicken embryo adapts 9 - 16 h; (3) Adding a sterilized silicone ring on half of the grade 1 vessels of the CAM; (4) Adding an equal amount of tumor cells within the ring.

1.3 CAM 移植瘤模型上加入抗肿瘤血管生长药物

接种瘤细胞 30 h 后,在超净台上打开胶布,观察肿瘤生长情况,淘汰 CAM 上没有肿瘤生长的种蛋。分别将传统和改良法制备成功的 CAM-U87 移植瘤模型蛋以随机数字表法随机分成 5 组,前 4 组为实验组,分别将已灭菌的 50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 沙利度胺^[13]和 G3B6^[9-10]加入 CAM 的硅胶药圈内;第 5 组作为阴性对照组,加含 0.1% DMSO 的 1% 明胶液。药圈内药液加入量为 50 μl ,用灭菌胶布封口,将种蛋回培养箱内。为保证药物有效浓度,设定时间点连续加药 3 次。

1.4 CAM 移植瘤组织微血管密度(microvessel density, MVD)的检测

第 3 次加药后 16 h,开窗将 CAM 移植瘤取出,置 PBS 中,应用体视显微镜拍照。将含有肿瘤灶的 CAM 膜包埋、切片、H-E 染色,在正置显微镜下拍摄,并应用 IPP 软件测量肿瘤区域血管的面积(V),计算 MVD^[14]。MVD(%) = 肿瘤血管 V /肿瘤区域亮区 V + 肿瘤区域暗区 $V \times 100\%$ 。

1.5 原位杂交(in situ hybridization, ISH)技术检测 CAM 移植瘤中 VEGFR-2 的表达

将 VEGFR-2 特异性片段(365 bp)进行 PCR 扩增,其引物如下:上游引物 5'-AAGAGGATTCGGGC-CTCTCT-3',下游引物 5'-CCCTGACTGGTAGCCACT-TG-3'。将扩增片段克隆到含 T3 和 T7 启动子 T 载体中,再用 T3 或 T7 转录酶和 dNTP(含 Bio-dUTP)体系制备探针,以 1:50 溶于杂交液。将肿瘤组织制成 8 μm 切片,烤片后蛋白酶 K 处理。每张玻片滴加 100 μl 杂交液进行预杂交,37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h,甩干,滴加 15~20 μl 探针,盖上盖玻片,湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,用亲和素-地高辛抗体放大信号,加入 HRP 标记的地高辛抗体,DAB 显色,苏木精复染,风干,拍照,褐色部分为阳性结果。采用 IPP 软件测量和分析。

1.6 统计学处理

采用 Graphpad Prime 5 统计学软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用 F 检验,再进行两两 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 改良 CAM 移植瘤模型更有利于肿瘤的形成和血管的生长

改良方法能够成功地制备 CAM-U87 移植瘤。模型的制备过程没有影响 CAM 本身的血管生成和血液循环,鸡胚仍能正常生长。结果显示,传统 CAM 模型上瘤块数量少、体积较小且较分散(图

2A);改良方法的 CAM 上硅胶药圈内有明显的瘤块,且其体积显著大于传统方法(图 2B)。改良模型肿瘤细胞接种的成功率显著高于传统方法 [(70.00 \pm 4.23)% vs (41.25 \pm 5.15)% ; $t = 4.314$, $P = 0.0007$],改良方法的移植瘤体积较传统方法的明显增大 [(60.20 \pm 6.01) vs (15.97 \pm 2.40) mm^3 ; $t = 6.012$, $P < 0.0001$]。

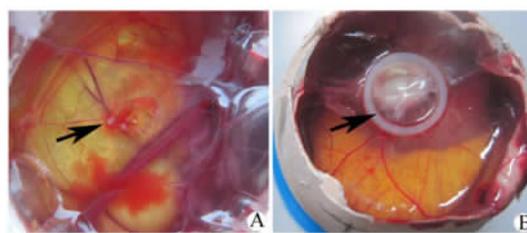


图 2 改良 CAM 模型接种瘤细胞能更有效地形成肿瘤

Fig. 2 Tumor cells transplanted on CAM by the modified method could form a tumor more effectively

A: Traditional method; B: Improvement method.

The arrows indicate the xenograft

2.2 沙利度胺有效抑制改良 CAM -U87 移植瘤组织中的血管生成

显微镜观察(图 3)发现,DMSO 组移植瘤($n = 10$)组织中血管丰富;低剂量沙利度胺组($n = 6$)肿瘤实体中一部分组织呈出血坏死状态,血管密度减小;中和高剂量组瘤块($n = 4$)完全变成出血瘤块。H-E 染色显示,随着用药浓度增加,瘤块中出血范围加大,且组织坏死加重,MVD 减少;DMSO 组瘤组织良好,微血管丰富。

经 IPP 软件测量和 Graphpad 软件分析显示,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 沙利度胺实验组移植瘤组织中的 MVD 与阴性对照组没有显著差异 [(17.11 \pm 4.70)% vs (29.80 \pm 4.16)% ; $t = 2.025$, $P = 0.0825$],200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [(15.85 \pm 1.15)% vs (29.80 \pm 4.16)% ; $t = 2.49$, $P = 0.0474$]与 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 沙利度胺组 [(15.29 \pm 11.23)% vs (29.80 \pm 0.04)% ; $t = 3.011$, $P = 0.0474$]的 MVD 显著降低。

2.3 G3B6 有效抑制改良 CAM-U87 抑制率组织中血管生成和 VEGFR2 的表达

显微镜观察结果(图 4)显示,随着新型抗血管生成药物 G3B6 药物浓度增加,肿瘤生长受到抑制且坏死区域增加。ISH 结合 H-E 染色结果显示,随着 G3B6 浓度的增加,VEGFR2 表达明显减少,MVD 也明显减少。

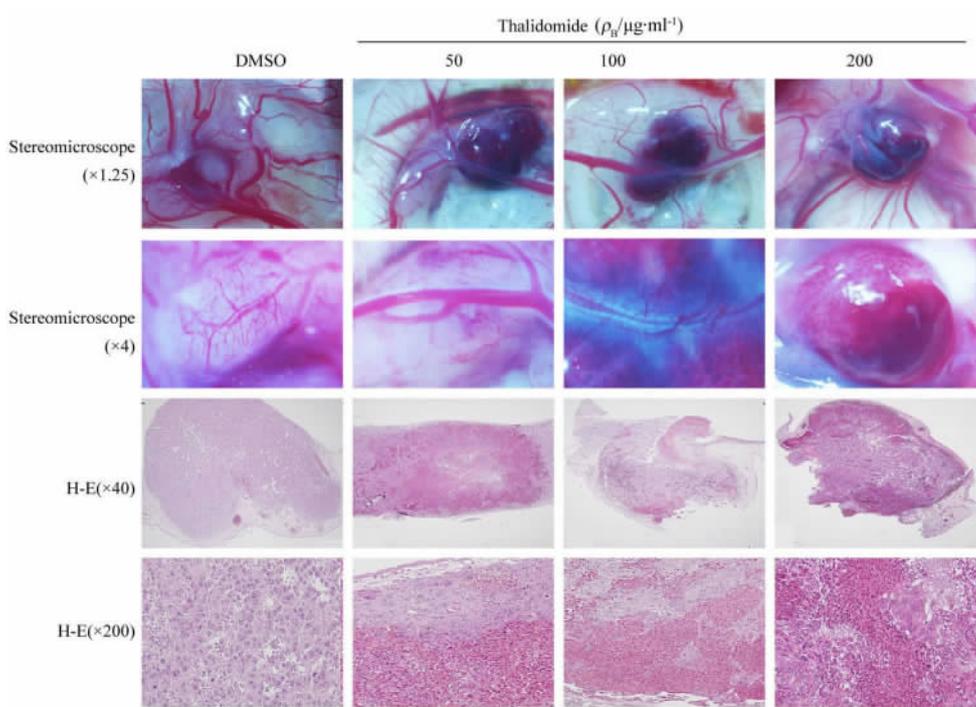


图 3 沙利度胺能够有效地抑制改良 CAM-U87 移植瘤血管生成

Fig. 3 Thalidomide inhibited the angiogenesis in modified CAM-U87 xenograft tissues effectively

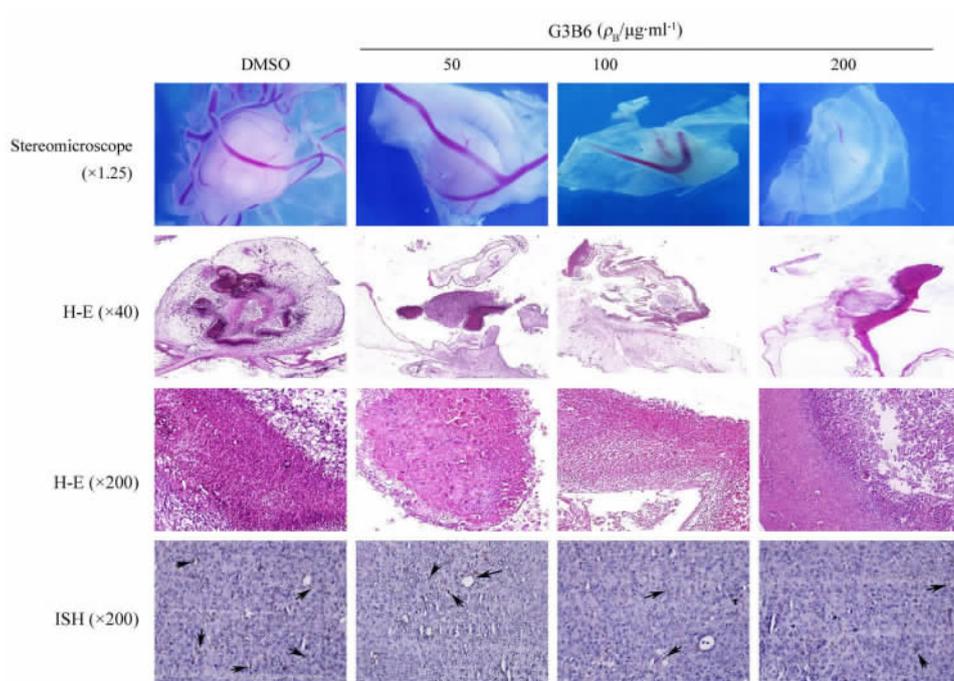


图 4 G3B6 有效抑制改良 CAM-U87 移植瘤的 MVD 和 VEGFR2 的表达

Fig. 4 G3B6 reduced the expression of VEGFR2 in modified CAM-U87 xenograft tissue effectively

The arrow showed that VEGFR2 express at the edge of the vessel and the tumor

3 讨论

近年来,国内外已经有人成功利用 CAM 模型接

种肝癌^[15]、肾癌^[16]和神经胶质瘤细胞^[17],但是文献中没有详细介绍实验方法,且模型不能明确显示药物对新生血管的抑制是否有效。各文献中不同肿瘤细

胞接种的效果都不同,拍摄肿瘤实体的图片形态各异,难以在固定范围之内作比较。本课题对文献提供的传统 CAM 模型进行了改良,成功地制备了改良 CAM-U87 移植瘤,提高了接种的成功率和移植瘤的生长率。改良 CAM 模型的改进点有:(1)在接种肿瘤细胞前,将鸡胚开窗使之适应培育箱环境 9~16 h。(2)在 CAM 上放置硅胶药圈,使接种的肿瘤细胞和药物不会流动扩散;操作时硅胶药圈应放置在一级血管半侧,使既能保证胶圈的定位,对 CAM 血管的压迫降到最低,又能使肿瘤细胞能够依附 CAM 血管获取营养。(3)摄制图像的改进,将蛋壳剪开,将 CAM 移植瘤的区域放置于体视镜下,加入 1×PBS 后再进行拍摄,确保拍摄实验结果的真实性和成像优质。(4)应用 H-E 染色和原位杂交技术检测肿瘤组织 MVD 和 VEGFR2 的表达。

为了验证改良模型应用于抗肿瘤血管生成药物筛选的可靠性,用已知的抑制血管新生的阳性药物沙利度胺^[13,18-19]对改良 CAM-U87 移植瘤进行处理。结果显示,随着药物浓度的增加,移植瘤组织中血管新生受到的抑制逐步加强,说明改良模型可成功应用于抗血管新生药物的筛选。进一步将此模型应用于一种正在研发中药物 G3B6 加以验证。G3B6 是新合成的能够抑制血管新生的化学药物,在传统 CAM 和鸡胚卵黄囊膜(chick embryo yolk sac membrane, YSM)模型上都能够抑制血管生成^[10];其对 HUVEC 成管有抑制作用,但是对肿瘤细胞并没有抑制效果^[18]。本实验中,G3B6 处理改良 CAM-U87 移植瘤模型后,肿瘤内的血管新生明显受到抑制,VEGFR-2 表达明显减少,肿瘤组织内 MVD 也明显降低。

综上所述,改良 CAM 移植瘤模型制备的成功率较传统方法明显增高,移植瘤体积也明显增大,能有效使用于抗肿瘤血管新生药物的筛选,具有良好的有效性和可行性。诚然,还需优化实验条件以提高鸡胚的生存率。本课题组将进一步验证更多肿瘤细胞系在改良 CAM 模型上的成瘤效果,同时结合药物的筛选和化合物的改造^[20-21]完善改良 CAM 模型在体外抗肿瘤实验中的应用。

[参 考 文 献]

[1] Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, et al. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(5): 1643-1648.

[2] Risau W. Mechanisms of angiogenesis [J]. *Nature*, 1997, 386(6626): 671-674.

[3] 吴学元. 肿瘤血管靶向治疗的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(1): 121-125.

[4] Dai C, Celestino JC, Okada Y, et al. PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(15): 1913-1925.

[5] Holland EC, Celestino J, Dai C, et al. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 55-57.

[6] Reilly KM, Loisel DA, Bronson RT. Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects [J]. *Nat Genet*, 2000, 26(1): 109-113.

[7] Aldhous P, Coghlan A, Copley J. Animal experiments -- where do you draw the line?: Let the people speak [J]. *New Sci*, 1999, 162(2187): 26-31.

[8] Hagedorn M, Zilberberg L, Wilting J, et al. Domain swapping in a COOH-terminal fragment of platelet factor 4 generates potent angiogenesis inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(23): 6884-6890.

[9] 周秦,何晓东,亓翠玲. DMPP 对于鸡胚血管形成的抑制作用 [J]. *广东药学院学报*, 2013, 29(3): 322-325.

[10] 曲文书,秦叔逵,吴穷. 重组人血管内皮抑制素抑制内皮细胞血管生成的实验研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2008, 3(4): 307-312.

[11] Risau W. Mechanisms of angiogenesis [J]. *Nature*, 1997, 386(6626): 671-674.

[12] Ribatti D, Vacca A, Costantino F, et al. Exogenous heparin induces fibronectin overexpression parallel to angiogenesis in the extracellular matrix of the chick embryo chorioallantoic membrane [J]. *Tissue Cell*, 1997, 29(2): 131-136.

[13] 林云华,钱晓萍,刘宝瑞,等. 沙利度胺抗肿瘤血管生成的临床研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(5): 322-325.

[14] 郑敏,王丽京,毛建文. 数字图像分析技术在鸡胚卵黄囊膜血管形成模型中的应用 [J]. *解剖学研究*, 2009, 31(1): 47-49.

[15] 班立丽,李玛琳,张慧,等. 人肝癌鸡胚尿囊膜移植瘤及其血管生成模型的建立 [J]. *肝胆外科杂志*, 2009, 17(3): 229-231.

[16] 张斌,阮喜云,陈杰,等. 人肾癌鸡胚模型的建立及其肿瘤生物学特性的研究 [J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2012, 33(1): 68-70.

[17] Strojnik T, Kavalari R, Barone TA, et al. Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(12): 4851-4860.

[18] Kumar S, Witzig TE, Rajkumar SV. Thalidomide as an anti-cancer agent [J]. *J Cell Mol Med*, 2002, 6(2): 160-174.

[19] 迟晓艳,曲明娟. 沙利度胺通过诱导 G1 阻滞和凋亡抑制血管内皮细胞增殖 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(9): 827-832.

[20] 王红阳,丁劲,冯赞. 细胞信号转导与靶向抗肿瘤药物的研发 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(5): 401-404.

[21] 吕峰,胡云章,姜述德. 表皮生长因子受体抑制剂在肿瘤治疗方面的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2004, 11(1): 75-77.

[收稿日期] 2014-02-25

[修回日期] 2014-03-10

[本文编辑] 黄静怡